

关于老年性痴呆 (AD) 的发病与防治, 情况极其错综复杂。“羰基应激”是“氧应激”和“糖应激”的共同核心过程, 也是脂褐素与老年斑形成的核心生化过程, 是 AD 等老年退行性疾病重要的早期分子病因。针对“羰基应激”, 从亚分子水平深入开展相关研究, 有望成功地将应激、疲劳、亚健康、衰老和 AD 有机地结合起来。

——印大中

羰基应激与衰老机理及阿尔茨海默病早期分子病因*

印大中^{1, 2)**} 刘文锋^{1, 2)}

(¹⁾ 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081;

(²⁾ 体适能与运动康复湖南省重点实验室, 湖南师范大学, 长沙 410012)

摘要 本文从人体衰老过程中重要的共性生化过程——羰基应激——的角度出发, 探讨老年性痴呆, 主要指阿尔茨海默病 (AD), 发生发展的早期分子病因。首先, 讨论与脂类、碳水化合物和蛋白质自由基氧化(氧应激)和非酶糖基化(糖应激)产生的羰基毒化作用相关的化学反应。接着, 列举活性羰基在 AD 患者体内存在的证据并探究这些羰基毒素对细胞结构与功能的影响。最后, 分析和归纳脑组织中针对羰基毒化的解毒机理, 进而探讨寻找基于该机理防治 AD 以至抵御衰老、疲劳、亚健康的方法与途径。

关键词 阿尔茨海默病(AD), 衰老, 羰基应激, 氧应激, 糖应激

学科分类号 R592, R34, Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00316

1 衰老机理、阿尔茨海默病与羰基应激的相关性

老年性痴呆与诸多老年退行性疾病和生物体衰老密切相关。因为老年性痴呆发生发展的早期分子病因与人体衰老过程的共性生化过程一脉相承, 本文将首先简略地回顾一些现代生物医学关于衰老机理及其生化本质的研究概况。

人类几千年的生物学和医学研究给我们当今的老年学和老年医学研究累积了约 300 多种衰老学说^[1]。可以说, 几乎每个老年性疾病和人体器官系统的老化表象都可以找到与之对应的衰老学说。这些衰老理论和假说经过千百年的发展衍变, 大浪淘沙, 至今仍有近 30 种衰老理论在相关领域延续发展, 顽强挺立^[2]。而这几十种衰老理论又基本可以分为“损伤机制理论”与“程序机制理论”两大类

型, 即所谓“环境因子”和“遗传因子”两类衰老决定因子。从某种程度上来说, 正是这两大类型的衰老因子的相互作用和相互制约共同决定了人类及动物在大自然中的生老病死进程。

近年来, “损伤与维护是决定生物体衰老”的两大要素的理念越来越显清晰, 似乎可以概括为: 损伤因环境, 维护靠基因; 更新保健康, 积累成老病^[3]。在环境因子造成生化损伤的研究领域, 数以千万计的研究将由能量代谢过程导致的两大生化副反应: “氧应激”和“糖应激”推到了“损伤元凶”的前台。透过现象看本质, “氧应激”和“糖

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2008AA02Z411)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-88872786, E-mail: dazhongyin002@126.com

收稿日期: 2012-06-26, 接受日期: 2012-06-29

应激”的共同核心过程——“羰基应激”也终于被推到了衰老生化机理的首要位置^[2]。

1992年,我们在研究老年色素形成机理的过程中,发现并提出了“羰基应激”是“氧应激”和“糖应激”的共同核心过程也是脂褐素形成的核心过程的原创思想^[4-5]。进而在1995年我们提出了狭义衰老学说——“羰基毒化衰老学说”^[6],并进一步大胆地提出了“清除羰基应激等代谢垃圾是高等动物睡眠过程中大脑与中枢神经系统重要的抗衰老生化过程”的假说^[7]。

在前述狭义衰老学说的基础上,2005年我们在国际上首先构建完成了以熵增为生物物理本质的广义衰老学说的雏形,所谓“衰老机理的本质是生化副反应损伤的失修性累积”^[2]。在这里,羰基应激恰恰是导致这个失修性熵增生化累积的关键过程。从脑老化的角度看,羰基应激也是与增龄相关的淀粉样蛋白形成、神经纤维缠结、共核蛋白富集、神经元自噬导致脂褐素堆积的重要生化基础;换言之,羰基应激是老年性痴呆发生发展举足轻重的上游生化分子病因。

目前,“熵增决定衰老,基因决定寿命”已成为老年学和老年医学领域重要的思想结晶^[8],2009年在法国巴黎召开的第十九届世界老年学大会上“衰老已不再是生物医学的不解之谜”得到了该领域诸多权威科学家不约而同的认可。尽管要使得生物医学界对于衰老机理这个生物物理和生物化学的解读达到共识仍需一定的时间和更充分的研究论证,然而从羰基应激等衰老共性生化过程出发,研究老年退行性疾病和老年性痴呆的早期生化起因,无论如何都会是一个很有理论研究价值和临床应用价值的方向与途径。

本文首先讨论由脂类、碳水化合物和蛋白质氧化糖基化产生的羰基毒化作用的化学反应。接着将列举活性羰基在阿尔茨海默病患者脑组织中存在的证据并探究这些羰基毒素对细胞功能的影响。最后,分析和研究人体与大脑中针对羰基毒化的解毒机理,进而寻找基于该机理防治阿尔茨海默病和多种神经退行性疾病的前卫方法和共性规律。

2 毒性羰基化合物及其化学性质

大量研究表明,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)形成的病理原因与自由基氧化和非酶糖基化,尤其与羰基应激有着密切的联系^[9-10]。

生物体内存在诸多活泼的毒性羰基化合物,它

们主要是生物大分子(如:脂类、糖类、氨基酸和蛋白质)的生化副反应产物。这些羰基化合物包括与氧化应激相关的不饱和醛酮,如4-羟基壬烯醛(4-hydroxy-nonenal, HNE)、丙烯醛(acrolein)、甲醛(formaldehyde)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)等数十种不饱和醛酮毒性产物,也包括由糖类降解而产生的高级糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)和被自由基氧化的蛋白质所形成的羰基化蛋白等。这些活泼的羰基化合物往往导致羰-氮反应,使蛋白质发生分子内或分子间的交联而影响其正常的结构和功能。阿尔茨海默病患者脑组织中观察到的老年斑、 β -淀粉样蛋白(A β)、神经纤维缠结和脂褐素等表征恰恰与羰基应激所造成的各种各样的“生物垃圾产物”相互印证。因此由羰基应激所引起的生物组织在增龄过程中由量变到质变的生化衍变很可能代表着AD和老年性痴呆以及其他老年神经退行性疾病的早期病理生理机制。

2.1 来源于脂类的羰基化合物

多元不饱和脂肪酸过氧化会产生多种具有很强生物反应活性的 α 、 β -不饱和醛类,其中HNE和丙烯醛对神经系统毒害最大,这两种化合物与最近发现的一些 γ -酮醛尤为值得重视^[10-11]。

HNE由于C2和C3间的烯键与C1的醛基相互作用,使得C3成为一个强亲电子中心,同时也由于C4上羟基的作用,C3电正性进一步强化^[11-12]。因此,C3能与许多亲核基团(如:巯基、组氨酸的次级氨基、赖氨酸的 ϵ -氨基及许多初级氨基)发生米歇尔(Michael)加成反应。HNE的功能性醛基与赖氨酸的 ϵ -氨基反应形成Schiff碱,最终通过与赖氨酰基反应而发生蛋白质交联^[11]。

丙烯醛比HNE更易与亲核基团反应。Picklo等的研究表明丙烯醛与线粒体亲核基团反应的速度快于HNE。丙烯醛的反应机制与HNE相类似,通过C3或C1的醛基与亲核基团发生反应^[12]。Uchida和他的同事已证实了赖氨酸的 ϵ -氨基与丙烯醛的C3反应能生成具有抗原性的衍生物。

异酮醛(isoketals)和神经酮醛(neuroketals)这两种 γ -酮醛,分别是花生四烯酸和二十二碳六烯酸的自由基损伤产物^[13]。它们非常活泼:无论与赖氨酸残基形成共价加合物,还是与蛋白质发生交联,其速度都快于HNE。异酮醛和神经酮醛能形成可逆的Schiff碱加合物,生成稳定的酮和酰基-酮加合物。神经酮醛-内酰胺蛋白质加合物已被证实存

在于大鼠的突触体和人的大脑皮层内^[13]。

2.2 高级糖基化终产物 AGEs

AGEs 的化学成分复杂, 形成机制有多种, 同时与糖尿病及衰老有着密切的联系。一种机制是葡萄糖等还原糖在链式构型下与生物分子的初级氨基形成 Schiff 碱^[14], 然后这个加合物经 Amadori 重排而产生 Amadori 产物, 在氧化条件下产生 AGEs。这些化合物包括吡咯(如吡咯啉)、吡啶、咪唑并吡啶、羧基烷基类产物(如: 羧甲基赖氨酸)。同时 Schiff 碱加合物可氧化产生 α -二羰基化合物, 如: 乙二醛和甲基乙二醛。糖在过渡金属的催化下也能氧化形成乙二醛和甲基乙二醛^[15]。这些化合物可进一步与赖氨酰基和精氨酰基发生加成反应。此外, 羧甲基赖氨酸(carboxymethyl lysine, CML)的形成还可能来自多不饱和脂肪酸的氧化, 而甲基乙二醛可由 3-磷酸甘油醛在生理条件下产生。

2.3 蛋白质羰基化合物

羟基自由基攻击蛋白质可引起其氨基酸侧链基团氧化而形成蛋白质羰基。这种羰基产物随氨基酸侧链的不同而有所不同, 苏氨酸氧化成 2-氨基-3-酮丁酸, 精氨酸和脯氨酸氧化成谷氨酸半缩醛, 赖氨酸氧化成氨基二酸半缩醛。其中谷氨酸半缩醛作为这些蛋白质羰基中最丰富的一种, 在体内和体外的研究中均已报道过。此外, HNE 等不饱和醛类能与蛋白质内的 ϵ -氨基反应, 导致蛋白质交联, 甲硫氨酸残基极易氧化成亚砷, 这种甲硫氨酸亚砷的形成在 β -淀粉样蛋白毒性中有重要作用^[16]。

3 AD 患者脑内羰基毒素含量增多的证据

3.1 AD 患者脑内源于脂质过氧化的羰基毒素

与同龄对照组相比, AD 患者脑内的 HNE 水平明显上升, 脑脊液中的游离 HNE 水平也增高。HNE 和丙烯醛等的蛋白质加合物可用适当的抗体, 通过免疫组化方法检测, 在 AD 患者脑内的病变区观察到了 HNE 蛋白加合物, 而对照组却几乎没有, 而且大多数 HNE-蛋白质加合物存在于神经元胞质和神经纤维缠结中, 却不存在于神经炎斑块中。Montine 等发现, 蛋白质的 HNE 修饰在组织和细胞中的分布与载脂蛋白 E(ApoE)的基因型有关, 这可能是由于 ApoE 在中枢神经系统的脂类运输中发挥重要作用。

丙烯醛在 AD 患者的扁桃体、海马和海马侧回的水平都较正常人偏高^[17]。AD 患者脑内的免疫组

化分析显示: 神经系统中的丙烯醛-蛋白质加合物 50%以上都是与神经纤维缠结相关的双螺旋丝状体(paired helical filaments, PHF)聚集物。

3.2 AD 患者脑内的 AGEs

散发性 AD 患者脑脊液中 Amadori 产物较同龄对照组上升了 70%。Vitek 等用 ELISA 方法发现: 从 AD 患者脑内斑块中分离出的 AGEs 比对照组多了 3 倍。而且蛋白质的 AGE 修饰与神经纤维缠结中的 PHF 相关联。另有研究发现, 从 PHF 分离出 Tau 蛋白已经发生非酶糖基化, 此糖基化的可能位点是微管蛋白结合区域的赖氨酸残基, 这种修饰作用可导致 Tau 蛋白和微管蛋白的相互作用降低并促进该蛋白质聚集成 PHF。

3.3 AD 患者脑内的蛋白质羰基化合物

蛋白质羰基可以通过氨基侧链被羟基自由基氧化而形成, 也可以通过与活性羰基化合物反应而形成。Hensley 等报道: 相对于小脑, AD 患者的海马和顶小叶下叶的蛋白质羰基含量分别有 42%和 37%的增加, 而对照组此三个脑区的蛋白质羰基水平基本相当。Smith 等发现脑内蛋白质羰基水平随年龄增长而上升, 但老龄组和 AD 组之间的差异不显著。利用羰基-二硝基苯肼衍生物的特异性抗体通过免疫组化方法测定蛋白质羰基, 科学工作者已经获得了关于细胞和亚细胞器的蛋白质羰基分布信息。与在 AD 患者海马切片上的神经元和神经胶质细胞核中观察到了蛋白质羰基免疫阳性类似, Smith 等在神经纤维缠结、神经元胞体和树突顶点处也观察到了高强度蛋白质羰基免疫阳性。

总之, 通过免疫组化等分析方法, 现已证实脂质过氧化、糖基化氧化和蛋白质氧化等的水平在 AD 患者脑部均上升。由于氧化产生的蛋白质羰基存在于 PHF 和淀粉样斑块等标志 AD 病灶的部位, 因此蛋白质修饰可能在 AD 的发病进程中起决定性作用。

4 模式系统中活性羰基化合物的生物毒性

4.1 HNE 和丙烯醛的生物毒性

HNE 是在 AD 造模研究以及相关研究中常用的毒性羰基物质, 它对人工培养的初级神经元、神经瘤细胞、神经胶质细胞的许多细胞功能都有影响。将大脑皮层突触体置于存在 HNE 的环境中培养, 结果大量的膜蛋白与 HNE 形成了加合物, 导致突触体膜蛋白的构象和膜双分子层的翻转性及流动性的改变^[18], 从而改变了膜蛋白的活性。

根据 Mark 等的报道, 在人工培养的大鼠海马神经元和突触体中, HNE 通过降低 Na^+/K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的活性, 使细胞内部的 Ca^{2+} 浓度上升. 将海马区和皮层神经元及皮层突触体暴露于 HNE 中, 将会导致葡萄糖吸收的抑制和葡萄糖转运蛋白 GLUT3 与 HNE 形成加合物. HNE 与谷氨酸盐转运蛋白 GLT1 反应, 使得大鼠脑皮层突触体和皮层星形胶质细胞中转运体 GLT1 的作用被削弱^[19].

HNE 不但对细胞膜蛋白有影响, 而且还干预线粒体的功能. Kruman 等发现, 在皮层突触体和 PC12 细胞中 HNE 衍生物对线粒体的抑制造成了线粒体跨膜电位的改变. Picklo 等发现在分离的大鼠脑线粒体中, HNE 通过抑制呼吸链复合物 II 和 III 的活性而抑制呼吸作用. Reichmann 等发现在 AD 患者大脑皮层的某些区域呼吸链复合物 III 的活性降低.

AD 病理学上的典型特征是神经元微管蛋白在生化特性上和结构上的改变. 研究发现, HNE 抑制神经突触生成并对 Neuor 2A 细胞的微管蛋白网络产生迅速的实质性破坏作用^[20]. 即使在低浓度的 HNE ($5 \sim 25 \mu\text{mol/L}$) 环境下暴露 15 min, 也可观察到微管蛋白的破坏, 这说明这部分亚细胞结构对 HNE 极为敏感.

Tau 蛋白是一种与微管相关的蛋白质, 它依赖磷酸化维持微管的性能稳定. Tau 蛋白磷酸化状态的改变是 AD 患者脑病变的标志性特征, 也是 PHF 的一个主要特征^[21]. 在 P19 神经胶质细胞的培养中, 暴露于低浓度的 HNE 会引起 Tau 蛋白电泳移动性的改变. 在培养大鼠海马神经元的过程中, 在 $2 \mu\text{mol/L}$ 的 HNE 中暴露 2 h 便会导致 Tau 蛋白的磷酸化程度增高, 使 Tau 蛋白对去磷酸化具有抵抗作用, 这可以被 AT8 抗体所识别.

HNE 能对许多信号传导级联系统造成影响. 将培养的大脑皮层神经元暴露于 HNE 中, 毒蕈碱、乙酰胆碱能和谷氨酸代谢亲和受体对 GTP- 结合蛋白受体 Gq11 的结合响应便被削弱. 在少突神经胶质细胞的祖细胞中, 在不引起致死的浓度下 HNE 会抑制生长因子所诱导的分裂激动和趋药性响应. 这些研究和发现表明, HNE 可能是在 AD 患者脑中观察到的导致信号转导系统发生改变的重要原因之一^[21].

病理生理学研究表明, 氧化应激作用的加强可导致核因子 Kappa B (NF- κ B) 的活性增大. 在培养

的大鼠皮层神经元中, HNE 抑制了基态和激发水平的 NF- κ B 对 DNA 的结合活性. 然而, HNE 与 p50 或 p65 NF- κ B 亚结构的结合产物并没有观察到, 这说明 HNE 在这些细胞中抑制了 NF- κ B 信号途径的上游因子. 在非激发细胞中, NF- κ B 通过与 I κ B α 结合存在于细胞质中. 适当的细胞刺激通过磷酸化、泛醌反应和蛋白质水解作用使 I κ B α 失活, 从而使 NF- κ B 游离并可转移进入细胞核. 对于非 CNS 系的细胞, HNE 使 I κ B 激酶烷基化, 从而抑制其激酶的活性和 I κ B α 的磷酸化.

4.2 AGEs 的生物毒性

AGEs 在模型实验系统中会诱导进一步的氧化损伤作用. AGE 修饰的牛血清白蛋白 (BSA) 在动物实验模型上使梗死几率上升. Lue 等的实验揭示了存在于微神经胶质细胞的 AGE 受体 (rAGE) 被 A β ($1 \sim 42$) 处理后间接被活化. Sasaki 和他的同事所做的另一些实验表明 rAGE 存在于星形细胞. 这种受体可能与 AGE- 修饰的蛋白质 CML 部分发生反应.

4.3 蛋白质羰基化合物

Aksenov 和他的同事研究了对羰基毒化极为敏感的蛋白质的识别. 在这些研究中, 取自 AD 患者脑中和正常人脑中的蛋白质与 DNPH 反应后双向电泳. 用这种方法, 鉴定出了 β -肌动蛋白、 β -微管蛋白和肌酸激酶同工酶 BB 等对羰基修饰较敏感的蛋白质. 这些发现支持以前的关于肌酸激酶同工酶 BB 在 AD 患者脑中的活性比正常人脑中的活性低并被羰基修饰的研究成果.

总之, 这些研究表明羰基应激可能是造成 AD 形成和发展的起因. HNE 可以影响与 AD 相关联的几个过程, 例如: 细胞骨架的损坏、谷氨酸盐的毒性及线粒体的机能障碍. 这些研究也显示了羰基化合物可以通过 rAGE 的介入导致更进一步的氧化损伤作用. 在这些研究中, 有的学者提出了羰基应激毒性的本质在于使多种酶活性丧失的观点. 当然, 如此获得性的毒性增加是否都归因于羰基的修饰作用这一点仍然需要继续探索, 但从生物酶含氨基或巯基的生化活性位点就是羰基毒化作用的靶点来看羰基应激是罪魁祸首应该没有疑问.

5 大脑中枢神经系统中的羰基转化反应

上文对羰基在大脑和神经元中的毒化作用作了阐述. 然而, 认识人体和大脑组织对毒性羰基进行转化的机制也十分重要. 毒性羰基清除能力的下降

在 AD 的发病机理及其他神经退行性疾病中扮演着重要的角色. 从羰基代谢的反应机理来讲羰基清除主要可以分为两个类型.

5.1 羰基代谢酶类型 I

氧化或还原醛 - 酮基团是羰基生物转化的重要步骤. 酶促还原使羰基转变成醇的反应是在醛 - 酮还原酶 (aldo-keto reductase, AKR) 和醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 的催化下进行的. 将毒性的醛氧化成为带羧基的酸是通过醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH) 和醛氧化酶催化的.

醛糖还原酶的表达遍及人类大脑皮层、海马组织、纹状体、黑质和小脑的神经元. 其免疫定位性质、酶的活性和酶的数量都不因 AD 的病理特性而改变. 虽然醛糖还原酶 AKR1A1 和 AKR1C1 对 HNE 的转化效率特别高, 但目前还没在人类大脑皮层上或海马中找到它们的踪迹^[21].

AKR7A2 与人类琥珀半醛还原酶的功能相似. 这种酶最初提纯于人脑, 它能催化琥珀半醛形成神经调节因子 γ - 羟基丁酸. 虽然这种酶对 HNE 的活性较小, 但对丙酮醛的作用却非常显著.

现已证明, 人体胶质细胞、细胞核膜和突起部位都会出现 AKR7A2 的免疫印迹. 只有极少部分神经元在前脑和内鼻皮层表达这种酶, 而在海马部位的神经元则表现出免疫阴性. AD 患者和具有 Lewy 小体的痴呆患者体内, AKR7A2 的免疫活性在前脑皮层、内鼻皮层和海马区的老年斑块中水平增高, 这是由于神经胶质增生的反应活性胶粒和微胶质细胞的激活所造成^[21].

醛脱氢酶系 (EC 1.2.1.3) 为第 I 类型醛代谢提供了将醛氧化成为酸的较为彻底的羰基转化途径. 有 3 种具有消除细胞毒性的醛类脱氢酶 (ALDH1、ALDH2 和 ALDH3) 得到了较深入的研究. 这 3 种酶都代谢 HNE, 并利用 NAD^+ 作为共同的作用因子. 其中 ALDH1 存在于细胞质中, 而 ALDH2 与乙醛代谢有关, 存在于线粒体基质中. ALDH3 存在于细胞质和微粒体中并能在体外培养中利用 NADP^+ . 大鼠的 ALDH3 能对许多烷基醛起作用, 但对 HNE 的作用却不明显.

在 AD 患者和正常人的大脑皮层和海马区域, ALDH2 只定位于神经胶质细胞, 但 ALDH1 却不是^[24]. 这个发现表明神经元线粒体在这些区域缺乏对活性醛类进行生物转化的基本代谢机制. ALDH2 在老年斑块中的表达水平上升, ALDH2 的免疫活性定位于星形胶质细胞和微胶质细胞中. 这

个发现被 AD 患者大脑皮层 ALDH2 活性较正常人增高这一事实所进一步证实. AD 患者 ALDH2 表达水平的上升可能仅为星形胶质细胞中基因表达全面增强中的部分表现. 然而, 在对培养的大鼠星形胶质细胞用脂多糖刺激 8 h 之后 ALDH2 基因表达水平则出现特异性的明显上升^[25].

胶质细胞 ALDH2 可能处于与脂质过氧化有关的神经退行性疾病发生的重要位置. 东方人由于 ALDH2 基因中碱基的改变而引起 ALDH2 活性的缺陷, 这种改变导致了四聚体结构 ALDH2 的活性丧失. 最近 Kamino 等的研究证实了患 AD 的风险在具有 ALDH2*2 等位基因的日本人中增高.

在类型 I 中这些羰基代谢酶类的生化状态可能是 AD 患者皮层神经元受损的重要因素. NADPH 是氧化型谷胱甘肽还原再循环酶系统所必需的辅酶. 因此, 氧化性毒化可能是因为氧化型谷胱甘肽水平的升高而耗尽 NADPH , 导致醛糖还原酶辅助因子的减少. ALDH2 的还原作用令 NADPH 再生, 使之能在呼吸过程中被利用. 另外, HNE 的酸性代谢产物可以进一步经 β 氧化而被彻底代谢.

5.2 羰基代谢酶类型 II

类型 II 的羰基生物转化作用通过醛类 (如: 丙烯醛和 HNE) 与谷胱甘肽 (GSH) 结合而实现细胞保护. GSH 与含有羰基亲电中心的化合物共价结合是谷胱甘肽转移酶 (GSTs) 所催化的. 人体组织中的 GSTs 可分为 8 大类 (A, M, P, K, S, T, O 和 Z), 已有大量文献阐述了 GSTs 的表达及其生化特性, 并作了广泛的论述. 尽管 GSTs 在亲电生物转化上占重要地位, 但直到最近人们才开始研究 GSTs 在脑中的特异性表达及它们与神经退行性疾病的关系. Lovell 等的一项研究已证明了 AD 患者脑内 GSTs 的总活性较正常人低.

GST A、GST M 和 GST P 是与羰基生物转化作用最为相关的 GSTs^[26]. 这几类 GSTs 对多种 α , β - 不饱和醛都有活性. GST A1-1 对丙烯醛等类似的短链醛的活性不高, 但对长于 7 个碳原子的 4- 羟基烯醛则有较高活性. 与 GST A1-1 相比, GST M1-1 对丙烯醛和 4- 羟基烯醛活性都较高. 此外, GST P1-1 比 GST A1-1 或 GST M1-1 对丙烯醛和碱基丙烯醛有较大活性. GST A、GST M 和 GST P 家族都包括许多成员. 各类 GST 家族中的每一个成员对底物的专一性也有很大不同, 例如人类 GST A4-4 对 HNE 的特异活性比 GST A1-1 高

40 倍。

当前, 各种 GSTs 在脑内的定位和表达正在研究中, Sidell 等的研究显示: GST A 在人的中脑、大脑皮层和基础神经中枢都没有免疫活性, 而 GST P 却定位于灰质和白质的神经胶质细胞中。GST M 的免疫活性定位于灰质的胶质细胞中, 而不在白质的胶质细胞中, GST M 的免疫活性也可在黑质、纹状体、苍白球和丘脑等部位显现。在这些研究中, 特定 GSTs 异构体的免疫活性情况尚未确定。在另一研究中发现, GST A4-4 定位于人脑的某些神经元中, 然而, 这些具有免疫活性的神经元的具体位置还没有报道。

因为酶的活性会随时间延长而下降, 死后间隔时间的长短是酶活性检测中所要考虑的重要因素。在检测 ALDH 的研究中, 正常人和死者组织中的醛糖还原酶和 GST 的有效活性保持时间是 3 h 或者更短。但小鼠大脑皮层的 ALDH 和其他还原酶的活性却在 3 h 之内基本不受影响^[25]。

5.3 限制羰基毒化的治疗方法

有关限制羰基毒化对机体的伤害, 已开展了许多理论和临床的研究。目前, 对羰基毒化作用的医药防护措施主要分为两大类。一类是用过量氨基化合物清除羰基毒素。体外实验已表明氨基胍与 HNE 分子 C1 上的醛能形成稳定的亚胺^[27]。另外一类是用 N-乙酰半胱氨酸攻击 C2、C3 间的双键清除 HNE 和丙烯醛^[28]。在非生理条件下(0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4, 室温)进行的核磁共振显示, 与 N-乙酰半胱氨酸一样, 氨基胍可以清除 HNE^[28]。然而, 在许多生物模式体系的抗 HNE 毒化实验中, N-乙酰半胱氨酸和它的甲氧基酯衍生物更优于氨基胍。氨基胍可能对清除乙二醛和甲基乙二醛这类羰基化合物有用, 但巯基清除剂对 α , β -不饱和醛的清除更为有效。

另一限制羰基毒化的途径是在基因表达上提高内源性解毒酶的水平。许多细胞保护酶类基因的启动子包含一个抗氧化元件。几种潜在的治疗药物正在研究中, 它们能提高抗氧化元件诱导基因的表达^[29]。许多有机硫化物, 包括自然形成的异硫氰酸盐, 如苯乙基异硫氰酸盐等, 能保护细胞免受氧化应激的损伤。在体内, 这些物质具有抗癌的功效。它们是否能成为治疗神经退行性疾病的可行性治疗剂有待进一步探讨。多方位的研究证实了抗氧化元件诱导基因在大鼠星形胶质细胞中可被刺激激发, 但在大鼠神经元中却不行。然而, 与大鼠神经

元相反, 人类 AD 患者海马区锥形神经元中 NAD(P)H 醌氧化还原酶的表达和活性都比正常人增强许多^[30]。

大量研究表明, 毒性羰基化合物几乎能与所有单胺类神经递质起反应并形成多种二聚或多聚老年色素样羰氨聚合物, 另外, 毒性羰基化合物与诸多以氨基或巯基为活性位点的蛋白质受体发生急性的或慢性的亲电反应。这些反应极有可能是生物体应激、疲劳、亚健康的重要生化原因。因此对生物体施以积极的抗羰基应激防治措施可以成为卓有成效的抗应激、抗亚健康, 以至抗老年退行性疾病的早期手段和方案。事实上, 在运动医学领域和防治 AD 等神经退行性疾病的医药领域, 许多药物中的功效成分, 或功能团因子恰恰都是具有阻抑羰基化合物毒性的生化基团在起关键作用。许多具有抗老年病、抗疲劳、抗衰老作用的中西医学药物, 如牛磺酸^[31]、一氧化氮、普鲁卡因、苯乙胺、精胺、多胺以及硫辛酸等等, 无不如此^[32-33]。

6 归纳与展望

现代生物学关于神经退行性疾病以及 AD 的相关研究及防治方略可谓深入浅出, 洋洋大观, 机关算尽。从氧应激、糖应激、光损伤、热损伤、炎症损伤到最终的 AD、帕金森病(PD)、亨廷顿舞蹈病(HD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)等等的机理研究、防治方法和药物应用, 虽然林林总总, 千姿百态, 然而似乎始终猜摸不定, 不得要领。关于防治老年性痴呆的新药物一个个站起, 又一个个倒下。究其原委, 似乎相关领域总是面对着一个捉摸不透的脑老化黑箱。或者我们可以用一个图来描述(图 1): 所谓脑老化研究, 千丝万缕、万念俱备, 却仍山重水复、疑窦丛生, 要参透天机、看破红尘总觉得还差点什么(图 1a)。

尽管 AD 的发病因素和机制十分复杂, 如遗传基因变异^[34-35]、表观遗传改变^[36]、内外环境因素影响^[37-38]、蛋白质异常修饰及在脑内沉积^[39-40]、神经营养及可塑性改变^[41-42]、氧化应激破坏^[43-44]、离子通道受损^[45]、金属离子代谢及能量代谢紊乱^[46-47]等等。但是, 当我们明白了羰基应激在衰老生化机理中的核心作用后, 我们的思绪就会变得豁然清晰——这千变万化背后的主旋律, 无非就是生命损伤与防御的大合唱。在所谓“抗应激, 扫垃圾, 换零件”防老抗衰的三大防御系统中, 抗羰基应激就是其中极为重要的清除代谢垃圾这一环, 补上了这

一环, 诸多问题似乎便可顺理成章, 柳暗花明 (图 1b).

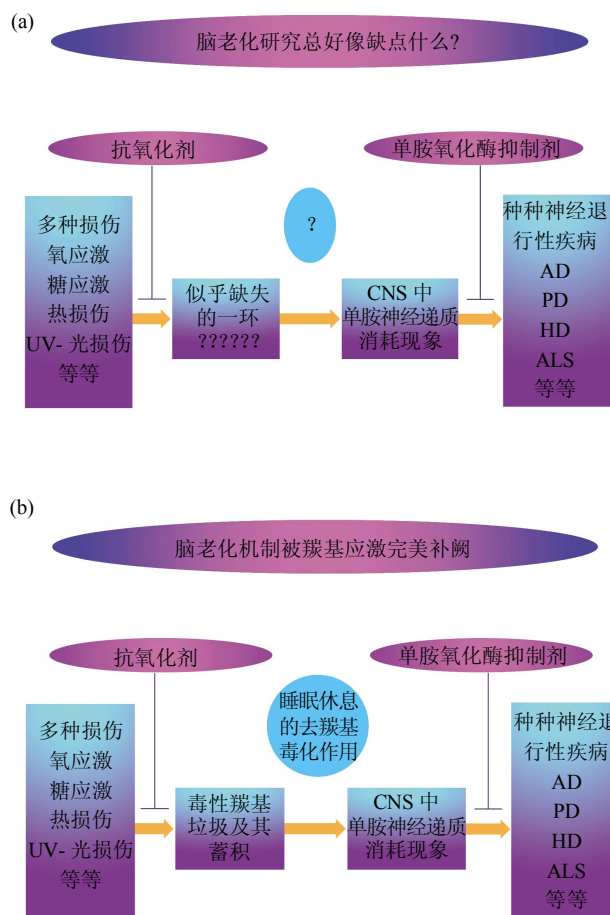


Fig. 1 Some important message is lacking in the research field of brain aging

图 1 脑老化研究总好像缺点什么?

(a)似乎缺失了一环.(b)羰基应激是最好的补充.

从图 1b 我们可以看到, 这个脑老化研究中始终阙如的一环就是积极应对“羰基应激”, 也就是机体日复一日的睡眠生化的可能机制. 抓住了羰基应激这个关键, 抗衰老、抗应激、抗亚健康就与防治老年退行性疾病有机地结合了起来. 目前这只是我们关于“积劳成疾衰老机理”的假说及其可在老年退行性疾病领域展开应用的预言. 愿与大家分享并作进一步共同探究.

总之, 从具有神经毒性的羰基化合物的形成、活性以及它们与神经退行性疾病之间的相关性来看, 虽然羰基化合物的生成机制很复杂, 但进一步的羰基毒性反应必然导致许多更复杂的病理生理后果. 蛋白质羰基修饰与 AD 的病理学标志相关联的

事实表明: 作为氧化损伤第二信使的羰基化合物和 AD 的产生与发展是直接相关的. 虽然减少氧自由基的产生以抑制脂类和糖的氧化反应可以限制毒性羰基的形成, 但羰基化合物的生物转化疗法仍不可或缺, 因为这些方法可以作为对神经退行性疾病的治疗措施, 也可以作为预防的手段.

宏观来看, 尽管由遗传信息调控的抗应激防御、蛋白质更新、新陈代谢和机体稳态等基因网络系统扮演着高等动物衰老的先天性制约因子的角色, 而自发进行的生化副反应导致的机体失修性改变则为环境相关因素导致生物体衰老的主要表现形式. 被氧自由基和非酶糖基化反应以及老年色素研究的最新成果推举而出的羰基毒化理论, 似乎更能代表普遍和深刻的超越其他理论的衰老分子机理, 这里, 分子共轭交联所造成的生物体熵增的改变, 则似乎是对生理性衰老的最为合适的物理化学诠释, 而以功能团反应为基础的“生化副反应损伤的失修性累积”则为衰老过程的生化本质.

可以认为, 人类对于衰老机理的认识已从“生物大分子水平”经由“小分子水平”走到了“亚分子功能团水平”, 看到了生物体生老病死的共性理化实质. 从哲学角度来讲, 我们的上述研究已在现代生物医学的还原分析、精确实证思维中, 融入了“功能为纲、综合归类”的中医思想精髓来透视生命万物发生发展的深层衍变规律^[48-49]. 值此, 人类防治衰老、应激、亚健康、以至老年退行性疾病的战略已经进入了可以关口前移, 对症下药的新时代.

参 考 文 献

- [1] Medvedev Z A. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev*, 1990, **65**(3): 375-398
- [2] Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp Gerontol*, 2005, **40**(6): 455-465
- [3] Holliday R. Aging and the decline in health. *Health*, 2010, **2**(6): 615-619
- [4] Yin D. Lipofuscin-like fluorophores can result from reactions between oxidized ascorbic acid and glutamine; carbonyl-protein cross-linking may represent a common reaction in oxygen radical and glycosylation-related ageing processes. *Mech Ageing Dev*, 1992, **62** (1): 35-46
- [5] Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med*, 1996, **21**(6): 871-888
- [6] Yin D. Studies of age pigments evolving into a new theory of biological aging. *Gerontol*, 1995, **41**(Suppl 2): 159-172
- [7] Yin D. Is carbonyl detoxification an important antiaging process

- during sleep?. *Med Hypoth*, 2000, **54**(4): 519–522
- [8] Hayflick L. Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both. *PLoS Genetics*, 2007, **3**(12): e220
- [9] Markesbery W R. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 1999, **56**(12): 1449–1452
- [10] Picklo M J, Montine T J, Amarnath V, *et al.* Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, **184**(3): 187–197
- [11] Amarnath V, Valentine W M, Montine T J, *et al.* Reactions of 4-hydroxy-2-nonenal and related aldehydes with proteins studied by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol*, 1998, **11**(4): 317–328
- [12] Esterbauer H, Schaur R, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 1991, **11**(1): 81–128
- [13] Bernoud-Hubac N, Davies S S, Bouteau O, *et al.* Formation of highly reactive gamma-ketoaldehydes (neuroketals) as products of the neuroprostan pathway. *J Biol Chem*, 2001, **276**(33): 30964–30970
- [14] Glomb M A, Monnier V M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem*, 1995, **270**(17): 10017–10026
- [15] Well-Knecht K J, Zyzak D V, Litchfield J E, *et al.* Mechanism of autooxidative glycosylation: Identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autooxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 1995, **34**(11): 3702–3709
- [16] Schoneich C. Redox processes of methionine relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*, 2002, **397**(2): 370–376
- [17] Lovell M A, Xie C, Markesbery W R. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging*, 2001, **22**(2): 187–194
- [18] Subramaniam R, Roediger F, Jordan B, *et al.* The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *J Neurochem*, 1997, **69**(3): 1161–1169
- [19] Keller J N, Pang Z, Geddes J W, *et al.* Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: Role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem*, 1997, **69**(1): 273–284
- [20] Mark R J, Pang Z, Geddes J W, *et al.* Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: Involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci*, 1997, **17**(3): 1046–1054
- [21] Neely M D, Sidell K R, Graham D G, *et al.* The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J Neurochem*, 1999, **72**(6): 2323–2333
- [22] Anderton B H, Callahan L, Coleman P, *et al.* Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog Neurobiol*, 1998, **55**(6): 595–609
- [23] O'Connor T, Ireland L S, Harrison D J, *et al.* Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J*, 1999, **343**(Pt 2): 487–504
- [24] Picklo M J, Olson S J, Hayes J D, *et al.* Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain Res*, 2001, **916**(1–2): 229–238
- [25] Picklo M, Olson S, Markesbery W, *et al.* Expression and activities of aldo-keto oxidoreductases in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001, **60**(7): 686–695
- [26] Ruan H, Tang X D, Chen M L, *et al.* High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(5): 2748–2753
- [27] Berhane K, Widersten M, Engstrom A, *et al.* Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(4): 1480–1484
- [28] Neely M D, Zimmerman L, Picklo M J, *et al.* Congeners of N (alpha)-acetyl-L-cysteine but not aminoguanidine act as neuroprotectants from the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med*, 2000, **29**(10): 1028–1036
- [29] Nakamura Y, Morimitsu Y, Uzu T, *et al.* A glutathione S-transferase inducer from papaya: Rapid screening, identification and structure-activity relationship of isothiocyanates. *Cancer Lett*, 2000, **157**(2): 193–200
- [30] Wang Y, Santa-Cruz K, DeCarli C, *et al.* NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2000, **21**(4): 525–531
- [31] 印大中, 汤 婷. 牛磺酸在防治老年病中的应用及其药理机制. *现代中西医结合杂志*, 2009, **18**(28): 3512–3515
- Yin D Z, Tang T. *Modern J Integrat Trad Chi Western Med*, 2009, **18**(28): 3512–3515
- [32] Li L, Li G L, Sheng S L, *et al.* Substantial reaction between histamine and malondialdehyde: a new observation of carbonyl stress. *Neuroendocrinol Letters*, 2005, **26**(6): 799–805
- [33] Aldini G, Dalle-Donne I, Facino R M, *et al.* Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev*, 2007, **27**(6): 817–68
- [34] Zhou J W. Recent progress in neurodegenerative disorder research in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 348–355
- [35] Cong L, Jia J. Promoter polymorphisms which regulate ADAM9 transcription are protective against sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2011, **32**(1): 54–62
- [36] Tong Z Q, Han C S, Luo W H, *et al.* Accumulated hippocampal formaldehyde induces age-dependent memory decline. *AGE* (2012) DOI: 10.1007/s11357-012-9388-8
- [37] He R Q, Lu J, Miao J Y. Formaldehyde stress. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(12): 1399–1404
- [38] Tong Z Q, Zhang J L, Luo W H, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in

- senile dementia. *Neurobiology of Aging*, 2011, **32**(1): 31–41
- [39] Liu Y, Qiang M, Wei Y, *et al.* A novel molecular mechanism for nitrated α -synuclein-induced cell death. *J Molecular Cell Biology*, 2011, **3**(4): 239–249
- [40] 许玉霞, 王洪权, 赵红, 等. 海马注射 β -淀粉样蛋白前体蛋白抗体诱导神经元的退行性变及学习记忆障碍. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(10): 908–918
- Xu Y X, Wang H Q, Zhao H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(10): 908–918
- [41] Zhang X H, Poo M M. Progress in neural plasticity. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 322–329
- [42] Luo Z G. Synapse formation and remodeling. Axon guidance and neuronal migration research in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 315–321
- [43] Zhang M, Zhao Z M, He L, *et al.* A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(1): 112–124
- [44] Sun P, Zhang Q, Han J Y, *et al.* TLR4 signaling induced TLR2 expression in the process of mimic cerebral ischemia/reperfusion *in vitro*. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(2): 223–228
- [45] Wang Y Z, Xu T L. Ion channels in neuronal survival. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 342–347
- [46] Luo Y F, Zhang J, Liu N Q, *et al.* Copper ions influence the toxicity of β -amyloid (1–42) in a concentration-dependent manner in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(6): 527–534
- [47] 刘玲玲, 盛柏杨, 龚锴, 等. 淀粉样肽 $A\beta$ 导致线粒体功能紊乱的体内和体外研究. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(2): 154–160
- Liu L L, Sheng B Y, Gong K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(2): 154–160
- [48] 印大中. 以现代科学解读中医治本. *中国中西医结合杂志*, 2007, **27**(7): 581–583
- Yin D Z. *Chi J Integrat Trad Western Med*, 2007, **27**(7): 581–583
- [49] Liang Z H, Yin D Z. Preventive treatment of traditional Chinese medicine as antistress and antiaging strategy. *Rejuvenation Research*, 2010, **13**(2–3): 248–252

Carbonyl Stress, Aging Mechanisms, and The Up-stream Molecular Etiology of Alzheimer's Disease*

YIN Da-Zhong^{1,2)*}, LIU Wen-Feng^{1,2)}

⁽¹⁾ Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

⁽²⁾ Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Sports Rehabilitation, Hunan Normal University, Changsha 410012, China)

Abstract The up-stream molecular causes of Alzheimer's disease (AD) have been discussed from the aspect of carbonyl stress, which represents an important common biochemical process of human aging. Firstly, chemical reactions of carbonyl toxification, induced by free radical oxidative stress and glycation stress, on lipids, carbohydrates and proteins are elaborated. Secondly, evidences of reactive carbonyls and their effects on cellular structure and functions in AD patients are provided. Finally, detoxification mechanisms against carbonyl stress in brain are analysed and summarized, and strategies based on the mechanism for treating AD, as well as for preventing aging, fatigue and sub-health are also introduced and discussed.

Key words Alzheimer's disease (AD), aging, carbonyl stress, oxidative stress, glycation stress

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00316

* This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China(2008AA02Z411).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-88872786, E-mail: dazhongyin002@126.com

Received: June 26, 2012 Accepted: June 29, 2012